

A krónikus escitalopram kezelés hatása a vigilanciára és a kvantitatív EEG-re REM-megvonás és akut 5-HT_{2C} receptor antagonistá adagolása után

Doktori tézisek

Kostyalik Diána

Semmelweis Egyetem
Gyógyszertudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Tóthfalusi László, egyetemi docens, Ph.D.

Hivatalos bírálók: Dr. Köles László, egyetemi docens, Ph.D.
Dr. Hernádi István, egyetemi docens, Ph.D.

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Rihmer Zoltán, egyetemi tanár, az MTA doktora

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Al-Khrasani Mahmoud, egyetemi adjunktus, Ph.D.
Dr. Jakus Rita, neurológus főorvos, Ph.D.

Budapest
2016

1 Bevezetés

1.1 Az alvás-ébrenléti ciklus és a théta oszcillációk

Az elektroenkefalográfia (EEG) az elektródok közötti potenciálkülönbségeket regisztrálja, melyek a kéregre merőleges, nagyszámú, egyszerre tüzelő neuron összegzett elektromos aktivitásából erednek. Az agy elektromos jeleit rágcsálókban a koponyacsontba ültetett, kemény agyhártyát érintő elektródok segítségével lehet mérni. Az alvást REM (rapid eye movement, gyors szemmozgásos) és non-REM (NREM) fázisra oszthatjuk fel. REM fázis során a vázizomzat teljes relaxációja jellemző; rágcsálókban a kortikális felszínről elvezetett EEG felvételeken hippocampális eredetű théta (5-9 Hz) hullámok dominálnak. Théta oszcillációk ébrenlét során is megfigyelhetők, emberben elsősorban különböző mnemonikai funkciók során, patkányokban pedig főleg exploratív lokomotoros tevékenységek kapcsán. Az alvás-ébrenlét szabályozás egy nagyon komplex folyamat, melyben számos neuronális rendszer részt vesz. Közülük a szerotonerg neuronok ébrenlét alatt tüzelnek a legintenzívebben, aktivitásuk csökken NREM alvás során és szinte teljesen szünetel REM alvás alatt. Az ébrenlétet és alvást kiváltó rendszerek között, oda-vissza gátló kapcsolat van, amint a szabályozó kör egyik komponense fölénybe kerül, kikapcsolja a másik oldalt. Az átváltás a neuronok nagy száma miatt nem azonnal megy végbe, ideje fajtól és az agy komplexitásától függően változik. A kölcsönös gátlás egyensúlyát döntően befolyásolják a cirkadián és a homeosztatikus tényezők. A vigilancia szabályozás egyik legfontosabb tulajdonsága az alvás vagy az ébrenlét stabil állapotának biztosítása.

1.2 Alvás és depresszió

A legtöbb depressziós betegnél alvászavarok jelentkeznek. Gyakori a fragmentált alvás és az álmatlanság. Utóbbi nemcsak a depresszió tünete, hanem annak rizikófaktora is lehet, ami egy erős, kétirányú kapcsolatot feltételez az álmatlanság és a depresszió patomechanizmusa között. Továbbá jellemző a REM alvás nyomás fokozódása, vagyis a REM alvásban töltött idő nő és rövidül a REM látencia. A legtöbb antidepresszáns gyógyszer csökkenti a REM alvást, valamint a REM

alvás megvonása javíthatja a depressziós betegek tüneteit. Az antidepresszáns hatás tartós fennmaradása érdekében a REM-deprivációs terápiát több napig, vagy akár több hétig kell folytatni, ami megegyezik az antidepresszáns farmakoterápia látencia idejével; a hatékonyság mögött részben az 5-HT_{1A} receptorok adaptációja feltételezhető. Egyes szerotonerg antidepresszánsok és az 5-HT_{1A} receptor antagonisták pindolol fokozták az alvás-megvonás terápiás hatását, valamint csökkentették a visszaalvás utáni relapszus előfordulását. A hangulatra gyakorolt pozitív hatás azonban a megvonást követő alvás után megszűnik, amire erős REM-visszacsapás jellemző. Mindezekből az következik, hogy a REM alvásban bekövetkező változásoknak döntő szerepük lehet a betegség kialakulása szempontjából, azonban a pontos mechanizmus máig felderítetlen. A reciprok interakciós elmélet szerint, a depressziót a fokozott kolinerg érzékenység, a kolinerg-aminerg rendszerek egyensúlyának felborulása okozza, ami magyarázatot adhat a REM nyomásra. Továbbá magyarázatul szolgálhat az alvás-megvonás után tapasztalt hangulati javulásra is, mivel az ébrenlét elnyújtásával megelőzhető a kolinerg transzmisszió éjjeli dominanciája és fokozódik a monoaminerg aktivitás a reggeli órákban. Pozitív terápiás hatása ellenére az alvás-megvonás nem egy adekvát módszer a klinikumban, hiszen nehéz kivitelezhetősége mellett hatása nem kiszámítható és csak átmeneti. Az alvás hiánya megzavarja a szervezet homeosztázisát, egészségesekben jellemzően rossz hangulatot, szorongást, metabolikus és kognitív zavarokat okoz; közrejátszhat a patológiás szorongás kialakulásában.

1.3 REM alvás-megvonás rágcsálókban, a „flower pot” metodika

Az alvás-megvonás tanulmányozása embereken igen nehéz feladat, így a rágcsálókban alkalmazható metodikák különösen fontosak az alvás mechanizmusainak mélyebb szintű megértéséhez. A depresszió rágcsáló modelljeiben gyakran megfigyelhetők a depressziósokra jellemző REM alvás-változások. A jelen értekezés alapját képező egyik kísérletben REM-megvonás céljából a „flower pot” („virágcserep”) módszert alkalmaztuk. A metodika a REM alatti izomatónia jelenségét használja ki, vagyis REM fázisba kerülés esetén az állat vízbe esik, ami ébredést okoz. A REM-megvonás utáni visszaalvásra fokozott REM

nyomás jellemző, ami a REM alvásban töltött idő növekedésében és rövidebb REM látenciában manifesztálódik. A REM megvonása mellett a metodika során egyéb erős stressz hatások is érik az állatokat (pl. izoláció, immobilizáció, vízbe esés, elázás); az állatok kontrollálhatatlan, elkerülhetetlen, szub-krónikus stressz expozíciónak vannak kitéve. Habár manapság a REM-megvonás még nem egy széles körben elfogadott modell a depresszió tanulmányozására, számos olyan rendszert befolyásol, mely kapcsolatba hozható a stresszel. A „flower pot” módszernek vannak ugyan korlátai, de jó látszat és konstrukciós validitással rendelkezik.

1.4 SSRI antidepresszánsok

A szelektív szerotonin visszavétel gátló (SSRI) antidepresszánsok (escitalopram, citalopram, fluoxetin, fluvoxamin, paroxetin, sertralín) a legszélesebb körben használt antidepresszánsok napjainkban. A depresszió monoamin hipotézise szerint depressziósokban a monoaminok, mint például a szerotonin (5-HT) extracelluláris koncentrációja nem elégséges. A neurotransmitter receptor hipotézis pedig azt feltételezi, hogy a monoaminerg receptorok up-regulációja (a receptorok számának és/vagy érzékenységének fokozódása) vezet a depressziós állapot kialakulásához. Az SSRI antidepresszánsok a szinaptikus részbe került 5-HT visszavételének gátlásával fokozzák annak extracelluláris szintjét. Az 5-HT főként a neuronok szomatodenritikus régiójában akkumulálódik, ahol az 5-HT_{1A} autoreceptorokhoz kötődve gátolja a sejtaktivitást. Így az SSRI-k akutan csökkentik a szerotonerg aktivitást és szorongást okoznak. Terápiás hatásuk megjelenéséhez és az akut mellékhatások, mint a szorongás megszűnéséhez több hetes szedésre van szükség. Az 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B} és 5-HT_{2C} receptorok funkcióinak csökkenése különösen fontos lehet klinikai hatékonyságuk szempontjából. Az SSRI-k akut adagolás után csökkentik a REM mennyiségét, fokozzák a REM látenciát és az ébrenléteket. A gyógyszerelés megszakítása esetén REM-visszacsapás következik be, ami feltehetően a megemelkedett kolinerg tónusnak köszönhető. Az escitalopram a legszelektívebb és leghatékonyabb SSRI, azonban nem minden beteg reagál megfelelően a terápiára.

1.5 Az 5-HT_{2C} receptor antagonisták

Az 5-HT_{2C} receptor antagonisták ígéretes ligandoknak bizonyulnak az antidepresszáns hatás fokozása és a szorongáscsökkentés szempontjából. Krónikus SSRI kezelést követően az 5-HT_{2C} receptor válasz csökkenése fokozta a mezolimbikus dopaminerg rendszer aktivitását, melynek döntő szerepet tulajdonítanak az antidepresszáns hatás kialakulásában. Továbbá egyes antidepresszánsok (pl. fluoxetin, ritanserin, agomelatin, trazodon) és a legtöbb atípusos antipszichotikum rendelkezik 5-HT_{2C} receptor antagonistá tulajdonsággal. Az 5-HT₂ receptorok altípus szelektív, nagy affinitású ligandjainak hiánya miatt, a receptor behatóbb tanulmányozására csak az utóbbi években nyílt lehetőség. Ezek a receptorok a központi idegrendszer számos területén előfordulnak, fontos szerepük van a szorongás, alvás, tanulás, lokomotoros aktivitás, hormonszekréció és az étvágy mechanizmusainak szabályozásában. Egyes magas szelektivitást mutató 5-HT_{2C} receptor antagonisták, mint például az SB-242084 szorongáscsökkentő hatásának bizonyult, valamint az alvás kvantitatív analízise (Q-EEG) alapján fokozta a theta hullámok teljesítményét rágcsálókban. A REM alvás és ébrenlét alatt domináló hippocampális theta ritmust a mediális szeptum GABA (gamma-aminobutyric acid, gamma-amino-vajsav)-erg és kolinerg neuronjai generálják. Ezek a sejtek erős szerotonerg beidegződést kapnak a raphe magok területéről. Az 5-HT_{2C} receptorok az említett agyterületeken posztzinaptikusan fordulnak elő a szerotonerg idegvégződéseken, valamint szomatodenritikus heteroreceptorokként funkcionálnak GABAerg interneuronokon. A receptorok aktivációja tónusos gátlást fejt ki a theta hullámokra a GABAerg sejteken keresztül. Az 5-HT_{2C} receptor antagonisták jellemzően emelik a theta oszcillációkat rágcsálókban, mely hullámokat a tanulási- és memóriefolyamatokkal hoztak szoros összefüggésbe.

2 Célkitűzések

Vizsgálataink középpontjában a krónikus escitalopram kezelés alvására gyakorolt hatásai álltak patkányokban.

- A „flower pot” módszer után fellépő visszaalvás architektúráját már számos kutatócsoport vizsgálta, azonban az alvás mikrostruktúráját Markov-láncokkal még nem analizálták. Továbbá a szakirodalom szintén nem számol be a krónikus SSRI kezelés visszaalvásra gyakorolt hatásairól sem. Első kísérletünkben (Escitalopram-Rebound) a 72 órás „flower pot” procedúra utáni visszacsapási periódus első 2 órájának **(1)** makro- és **(2)** mikroarchitektúráját (Markov-láncok) elemeztük, valamint **(3)** elvégeztük az alvás Q-EEG analízisét is. Továbbá vizsgáltuk azt is, **(4)** hogyan befolyásolja az egyes változókat a krónikus escitalopram kezelés (10 mg/kg, ozmotikus mini pumpa, 24 napig) (Kostyalik és mtsai 2014b).
- Az egyes 5-HT_{2C} receptor funkciók változásait krónikus antidepresszáns kezelés hatására már sokan tanulmányozták, a théta oszcillációkat illetően azonban nincs információ. Második vizsgálatunkban (Escitalopram-5-HT_{2C} receptor) tehát arra kerestük a választ, **(5)** hogyan befolyásolja a krónikus escitalopram kezelés (10 mg/kg, ozmotikus minipumpa, 21 napig) az akut 5-HT_{2C} receptor antagonistá SB-242084 (1 mg/kg, i.p.) théta aktivitást fokozó hatását a passzív fázis első 3 órájában, zavartalan alvás-ébrenléti ciklussal rendelkező, szabadon mozgó patkányokban (Kostyalik és mtsai 2014a).

3 Anyagok és módszerek

3.1 Kísérleti elrendezés

A kísérleteket hím *Wistar* patkányokon végeztük, melyeknek frontoparietális EEG és nyaki elektromiográfiás (EMG) elektródokat ültettünk be. Az állatok motoros aktivitást az EEG és EMG jeleket közvetítő kábel mozgásából detektáltunk. A dolgozatban szereplő mindkét kísérletben ozmotikus minipumpák (2ML4, ALZET, 2.5 µl/óra, 28 napig DURECT Corporation, USA) segítségével biztosítottuk az escitalopram krónikus adagolását, melyet a patkányok háti bőre alá ültettünk be. A minipumpákat előzetesen escitalopram-oxalát oldattal (10 mg/kg/nap; 0,3 N sósav oldatban oldva), vagy annak oldószerével

töltöttük fel. A kísérletek elvégzése előtt a patkányokat hozzászoktattuk a mérési körülményekhez.

Escitalopram-Rebound kísérlet

Azt vizsgáltuk, hogyan hat a krónikus (24 napos) escitalopram kezelés a 3 napos szelektív REM alvás-megvonást követő visszaalvás első 2 órájára. Az escitalopram kezelés 21. napján, a passzív fázis elején, az RD csoportokat egy-egy különálló, kör alakú víztartály közepén elhelyezkedő porondra helyeztünk. A táplálékhoz való folyamatos hozzáférés ez idő alatt is biztosítva volt. A 72 órás REM-megvonás végén az állatokat levettük a porondokról és a saját ketrecben tartott csoportokkal együtt a mérőketrecekbe helyeztük őket. A visszaalvás első 2 óráját rögzítettük. Az állatokat véletlenszerűen 4 kísérleti csoportba osztottunk a krónikus kezelés [escitalopram (SSRI) vagy vivőanyag (vehiculum, VEH)] és a REM alvás-megvonás [REM megvonás (REM deprivation, RD) vagy saját ketrecben tartás (home cage, HC)] alapján:

- HC-VEH; n=6
- HC-SSRI; n=7
- RD-VEH; n=7
- RD-SSRI; n=7

Escitalopram-5-HT_{2C} receptor kísérlet

Ebben a kísérletben azt vizsgáltuk, hogyan befolyásolja a krónikus escitalopram előkezelés (21 napos) az akut 5-HT_{2C} receptor antagonistá SB-242084 [SB, 6-chloro-5- methyl-1-{[2-(2-methyl-3-pyridyl)oxy]-5-pyridyl carbamoyl}, 1 mg/kg, 10 % (2-hydroxypropyl)- β -cyclodextrin oldatban oldva] kezelés hatásait a Q-EEG spektrumra. Az akut i.p. kezelést közvetlenül a passzív fázis elején adagoltuk, majd elkezdődött az EEG felvételek 3 órás rögzítése. Az állatokat 4 kísérleti csoportba osztottunk a krónikus előkezelés (SSRI vagy VEH), valamint az akut i.p. kezelés (SB-242084 vagy vehiculum, veh) alapján:

- VEH+veh; n=6
- VEH+SB; n=6
- SSRI+veh; n=7

- SSRI+SB; n=6

3.2 Alvás analízis és statisztika kiértékelés

Az EEG jeleket 4 másodperces szakaszonként (epoch) a *SleepSign for Animal* (Kissei Komtec America, Inc, USA) alvásértékelő program segítségével az alábbi kritérium rendszer alapján vizuálisan elemeztük:

- **Aktív ébrenlét (active wake, AW):** alacsony amplitúdójú, főleg alfa (8-13 Hz), béta (14-30 Hz), gamma (30-60 Hz), valamint théta (5-9 Hz) tartományba eső EEG hullámok; intenzív EMG és motoros aktivitás;
- **Passzív ébrenlét (passive wake, PW):** alacsony amplitúdójú, főleg alfa (8-13 Hz), béta (14-30 Hz), gamma (30-60 Hz), valamint théta (5-9 Hz) tartományba eső EEG hullámok; fokozott EMG; minimális motilitás;
- **Felszínes lassú hullámú alvás (light slow-wave sleep, SWS-1):** nagy amplitúdójú delta hullámok (0,5-4 Hz), melyeket alacsony feszültségű alvási orsók (6-15 Hz) szakítanak meg; csökkent EMG és motoros aktivitás;
- **Mély lassú hullámú alvás (deep slow-wave sleep, SWS-2):** folyamatos, nagy amplitúdójú delta (0,5-4 Hz) hullámok jellemzik, csökkent EMG és motoros aktivitás jellemzi;
- **Átmeneti stádium (intermediate stage, IS):** théta hullámok (5-6 Hz) és orsók (átlag 12,5 Hz) szokatlan együttes megjelenése rövid szakaszokban, REM-alvás előtt és után.
- **Gyors szemmozgásos alvás (rapid eye movement sleep, REM-alvás):** egyenletes amplitúdójú théta hullámok (5-9 Hz), az izomtónus hiányzik, izomrángások viszont jellemzők.

Mindkét kísérletben elvégeztük az EEG teljesítménysűrűség spektrumának elemzését (Q-EEG) a gyors Fourier transzformáció segítségével, mely az adott frekvenciához tartozó elektromos teljesítményt adja meg μV^2 mértékegységben. Vizuális alváselemzés keretében előzetesen kizártuk a műterméket tartalmazó epochokat. A Q-EEG-t az 1,25-60 Hz frekvencia tartományban vizsgáltuk, melynek során kiemelt figyelmet fordítottunk a théta tartományra (5-9 Hz).

Escitalopram-Rebound kísérlet

A hipnogramokat az alábbi módszerek segítségével vizsgáltuk:

- Deskriptív statisztikai analízis,
- Markov-lánc modell,
- Q-EEG analízis.

Deskriptív statisztikai analízis

A vizsgált alvásparaméterek a visszaalvás összegzett első 2 órájában:

- Alvásfázisokban töltött összes idő;
- Alvásfázis epizódok darabszáma és átlagos időtartama [egy epizód időtartama ≥ 4 mp (1 epoch)];

Az alvásfázisokat a fenti paraméterek esetében az alábbiak szerint csoportosítottuk: Ébrenlét (AW és PW), NREM alvás (SWS-1, SWS-2 és IS), REM alvás és összes alvás (NREM és REM alvás).

- Alvásfragmentáció: a bármely alvásfázist megszakító ébredések számának összege;
- REM alvás látencia: az elalvás kezdetétől az első REM epoch megjelenéséig eltelt idő;
- Alvás látencia: a passzív fázis kezdetétől az elalvásig, vagyis az első SWS-1 epoch megjelenéséig eltelt idő;
- Első REM szakasz hossza: az első REM szakasz időtartama (az első REM epoch után az IS epochok beleszámítanak);

Adatainkat kétutas varianciaanalízis (ANOVA, analysis of variance) segítségével értékeltük ki [faktorok: kezelés (VEH vagy SSRI) és REM-megvonás (HC vagy RD)], melyet Tukey post hoc teszt követett. A csoportok közötti szignifikáns különbségeket a post hoc teszt alapján, $p < 0,05$ esetén állapítottuk meg. Az analízisek, valamint a grafikonok a Prism 6 (GraphPad Software, Inc., USA) szoftver segítségével készültek.

A hipnogram analízise Markov-láncokkal

A hipnogramokat időben folytonos Markov-láncokkal modelleztük. A Markov-lánc modell egy numerikus optimalizáláson alapuló nemlineáris regressziós modellezési technika. Vizsgálataink során az elsődleges kérdésünk az volt, hogyan viszonyul az egyes fázisátváltások sebessége a kezelési csoportokban a kontroll csoporthoz képest. Ezért a kezelési csoportok adatait a kontroll csoportra (HC-VEH) normalizáltuk, és ezeket a relatív értékeket normalizált fázisátváltási sebességnek (normalized transition rate; NTR) neveztük el. A szignifikancia meghatározására hagyományos statisztikai tesztek helyett konfidencia intervallumot használtuk. Abban az esetben, ha egy kezelési csoportra jellemző átváltásai sebesség konfidencia intervalluma nem foglalja magában az 1-et, a kezelés hatását szignifikánsan különbözőnek tekintjük a kontroll csoporthoz képest 5 %-os alfa hiba mellett ($p < 0,05$). Továbbá ha két kezelési csoport NTR értékeinek konfidencia intervalluma nem fed át, a két csoport szignifikánsan különbözik egymástól ($p < 0,05$). Ha egy kezelési csoportra jellemző $NTR > 1$, az adott fázisok közötti átváltás gyorsul, ha pedig $NTR < 1$, lassul a kontroll csoporthoz képest. Az átváltási sebességeken kívül meghatároztuk az egyes vigilancia fázisokban két fázisváltás közötti tartózkodási idők becsült átlagát (a továbbiakban tartózkodási idő). Ennek a paraméternek az abszolút értékei a megfelelő 95%-os konfidencia intervallummal vannak ellátva. Két tartózkodási idő értéket statisztikailag különbözőnek tekintünk, ha a konfidencia intervallumaik nem fednek át egymással. A konvergencia elérése érdekében azonban az alkalmazott modell és szoftver két limitációjával kellett szembesülnünk. Egyrészt problémát jelentett, hogy az átváltási sebességek konstansak és függetlenek az időtől. Ezt sikerült megoldanunk az adatok vizuális szegmentációjával, amikor a vizsgált szakaszt olyan stacionárius periódusokra osztottuk, amelyekben az észlelt átváltási frekvenciák viszonylag állandók voltak: kezdeti periódus, a visszaalvás első fél órája (0-2000 mp); stabil periódus, a visszaalvás fennmaradó másfél órája (2001-7200 mp). A másik problémát az jelentette, hogy a kezdeti periódusban csak két (ébrenlét, alvás), a stabil periódusban pedig csak három fázis (ébrenlét, NREM,

REM) esetében tudtunk sikeres konvergenciát elérni. A Markov analízist és a hozzá tartozó ábrákat az R programmal és a Markov-lánc analízisre specifikus R program csomag segítségével végeztük el.

Q-EEG analízis

Háromutas, ismétléses ANOVA-t használtunk [faktorok: kezelés (ismétlés nélküli; VEH vagy SSRI) és alvásmegvonás (ismétlés nélküli; HC vagy RD); theta (ismétléses: 5-9 Hz) és alfa frekvenciák (ismétléses: 10-13 Hz) SWS-1 fázisban; theta (ismétléses: 5-9 Hz) frekvenciák SWS-2 fázisban], amit Tukey post hoc teszt követett. A szignifikanciát $p < 0,05$ esetén állapítottuk meg. A teljesítménysűrűség spektrumok statisztikai analízisét, valamint a grafikonokat a Prism 6 (GraphPad Software, Inc., USA) szoftverrel készítettük.

Escitalopram-5-HT_{2C} receptor kísérlet

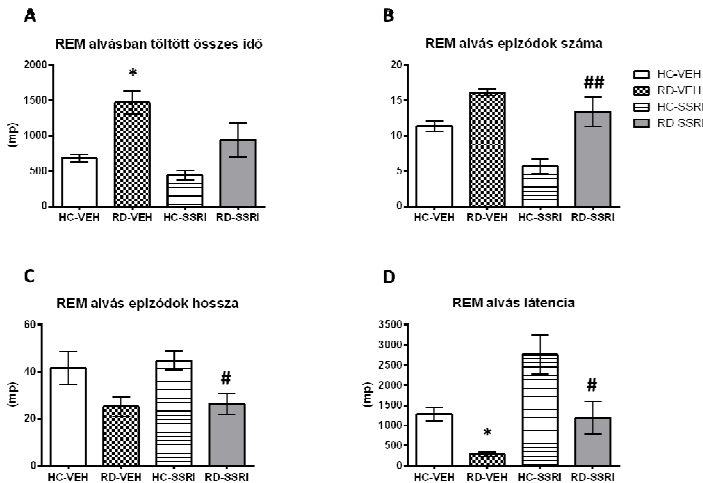
Q-EEG analízis

A theta frekvenciákat (5-9 Hz) AW és a REM fázisban óránként analizáltuk (AW: 1., 2. és 3. óra; REM: 2. és 3. óra). A számításokhoz a theta tartomány görbe alatti területének (area under the curve, AUC) értékeit hasonlítottuk össze az egyes kezelési csoportokban. Az adatokat kétutas, ismétlés nélküli ANOVA segítségével analizáltunk [faktorok: előkezelés (VEH vagy SSRI) és kezelés (veh vagy SB)], melyet Tukey post hoc teszt követett. Továbbá a theta frekvenciák és a kezelési csoportok között fennálló kapcsolat vizsgálata érdekében a teljesítménysűrűség értékeket kétutas, ismétléses ANOVA eljárással is kiértékelünk [nem ismétléses faktor: kezelési csoportok (VEH+veh, VEH+SB, SSRI+veh, SSRI+SB); ismétléses faktor: theta frekvenciák (5-9 Hz)], melyet Tukey post hoc teszt követett. A szignifikáns különbségeket $p < 0,05$ esetén állapítottuk meg. A statisztikai analízisek és a grafikonok elkészítéséhez a Statistica 7.0 (Statsoft Inc., Tulsa, OK, USA) szoftvert használtuk.

4 Eredmények

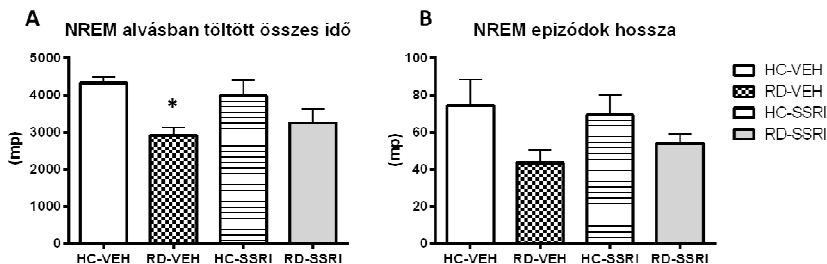
4.1 Escitalopram-Rebound kísérlet

Az alvásparaméterek deskriptív statisztikai módszerekkel való analízise



1. ábra REM alvás paraméterek a háromnapos REM alvás-megvonás utáni visszaalvás összegzett első 2 órájában. A REM alvásban töltött összes idő (A), a REM epizódok átlagos darabszáma (B) és hossza (C), valamint a REM alvás látencia (D). Az ábrák az átlagokat és a standard hibaértékeket (SEM) prezentálják, csoportonként 6-7 állat adatainak felhasználásával. *: szignifikáns különbség ($p < 0,05$) a Tukey post hoc teszt alapján az RD-VEH és a HC-VEH csoportok között; # és ## : szignifikáns különbségek ($p < 0,05$ és $p < 0,01$) a Tukey post hoc teszt alapján az RD-SSRI és a HC-SSRI csoportok között;

A REM alvás-megvonás REM-visszacsapást okozott a kontroll csoporthoz képest, mivel megnövelte a REM alvásban töltött összes időt, valamint csökkentette a REM alvás látencia idejét. A krónikus SSRI kezelés önmagában nem okozott jelentős változásokat a REM paraméterekben. Továbbá az escitalopram kezelés csak enyhén csökkentette a REM-megvonás után fellépő REM-visszacsapást (1. ábra).

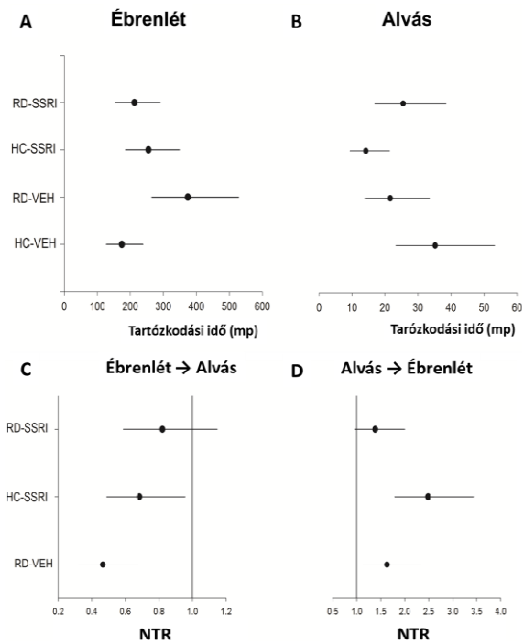


2. ábra NREM alvás paraméterek a háromnapos REM alvás-megvonás utáni visszaalvás összegzett első 2 órájában. A NREM alvásban töltött összes idő (A) és a NREM epizódok darabszáma (B). Az ábrák az átlagokat és a standard hibaértékeket (SEM) prezentálják, csoportonként 6-7 állat adatainak felhasználásával. *: szignifikáns különbség ($p < 0,05$) a Tukey post hoc teszt alapján az RD-VEH és a HC-VEH csoportok között;

A REM-megvonás a NREM epizódok hosszának redukciója révén csökkentette a NREM alvásban töltött összes időt a kontroll csoporthoz képest. A REM paraméterekhez hasonlóan, az escitalopram kezelés nem befolyásolta az alvás-megvonás NREM paraméterekre kifejtett hatását sem (2. ábra).

A hipnogram analízise Markov-láncokkal

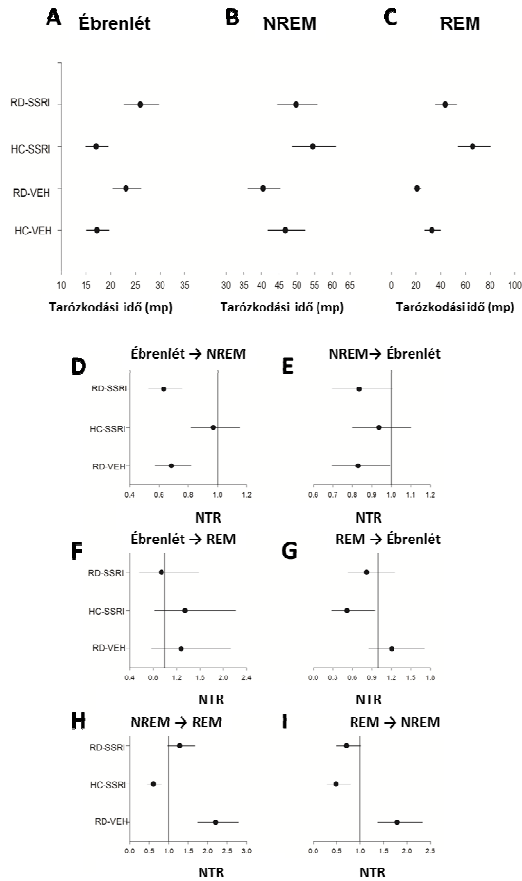
Kezdeti periódus (a visszaalvás első fél órája, 0-2000 mp; 3. és 5. ábra)



3. ábra Tartózkodási idő és normalizált fázisátváltási sebesség (NTR) értékek a REM-megvonás utáni visszaalvás kezdeti szakaszában (0-2000 mp). Az ébrenlét (A) és alvás (B) állapotokban való tartózkodási idők becsült átlaga két fázisváltás között, valamint az elalvás (C) és a felébredés (D) kontroll csoportra (HC-VEH) normalizált sebessége (NTR, Normalized Transition Rate; a HC-VEH csoport NTR értéke=1). Minden egyes pont (●) átlag értéket jelent, a vonal szegmensek pedig az átlag körüli 95%-os konfidencia intervallumot jelölik.

Önmagában mind a krónikus escitalopram kezelés, mind a REM alvás-megvonás fokozta az alvás fragmentáltságát. A két intervenció együttes alkalmazása esetén azonban hatásaik nem összeadódtak, hanem antagonizálták egymást (3. ábra).

Stabil periódus (a 2 órás visszaalvási periódus utolsó másfél órája, 2001-7200 mp; 4. és 5. ábra)

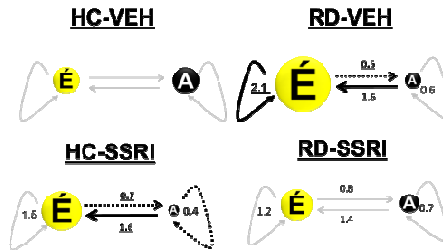


4. ábra Tartózkodási idő és normalizált fázisátvátsási sebesség (NTR) értékek a REM-megvonás utáni 2 órás visszaalvás stabil szakaszában (2001-7200 mp).

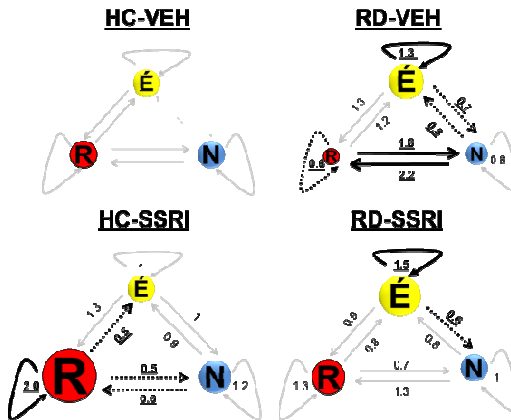
Ébrenlét (A), NREM (B) és REM alvás (C) állapotokban való tartózkodási idők becsült átlaga két fázisváltás között, valamint az ébrenlétből NREM-be (D), NREM-ből ébrenlétbe (E), ébrenlétből REM-be (F), REM-ből ébrenlétbe (G), NREM-ből REM-be (H) és REM-ből NREM-be (I) ugrások sebességének kontroll csoportra (HC-VEH) normalizált értéke (NTR; a HC-VEH csoport NTR értéke 1). Minden egyes pont (●) átlag értéket jelent, a vonal szegmensek pedig az átlag körüli 95%-os konfidencia intervallumot jelölik.

A REM alvás-megvonás REM fragmentációt okozott (csökkent a REM-ben tartózkodás ideje, a NREM és REM fázisok közötti átváltások sebessége megduplázódott). Ezzel ellentétben a krónikus escitalopram kezelés elnyújtotta a REM epizódokat (fokozódott a REM-ben tartózkodás ideje, a NREM és REM fázisok közötti ugrások lassultak), és kivédte az alvás-megvonás után jelentkező változásokat (4. ábra).

Kezdeti periódus



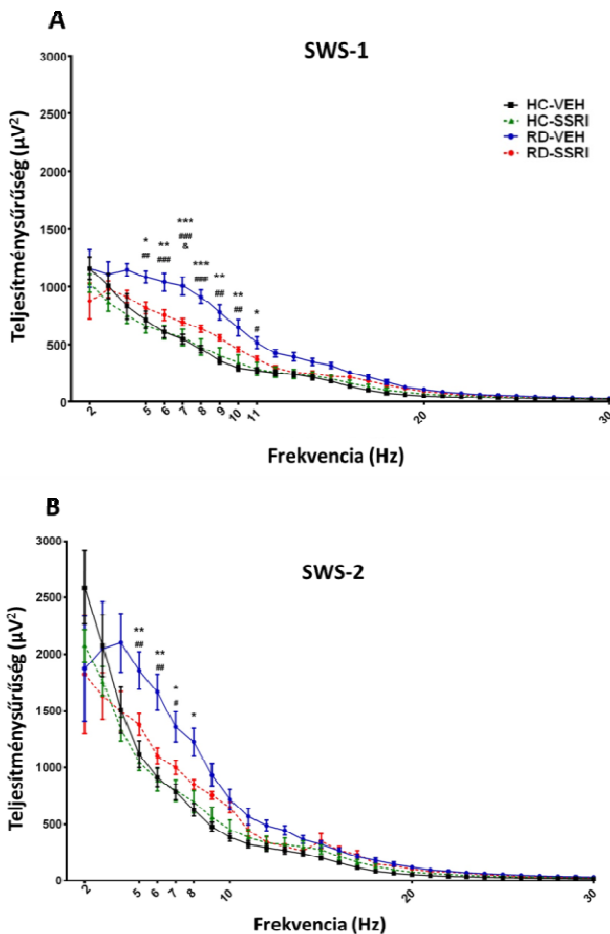
Stabil periódus



5. ábra A Markov-láncok sematikus ábrázolása a kezdeti (0-2000 mp) és a stabil (2001-7200 mp) periódusban. A szám adatok a fázisokban való normalizált tartózkodási idők (hajlított vonalak) és a fázisátváltási sebességek (NTR, egyenes vonalak) becslését prezentálják az egyes kezelési csoportokban a HC-VEH csoportra vonatkoztatva (tartózkodási idő és NTR értékek a HC-VEH csoportban=1). A körök mérete alkalmazkodik az adott vigilancia fázisban való tartózkodási időben mért változások mértékéhez a HC-VEH csoporthoz képest. A vastag, folyamatos

nyilak a szignifikáns növekedést, míg a szaggatott vonalak a szignifikáns csökkenést reprezentálják a HC-VEH csoport megfelelő értékeihez képest. A szignifikáns változásokhoz tartozó számszerű értékeket vastag, aláhúzott karakterek is jelölik.

Q-EEG



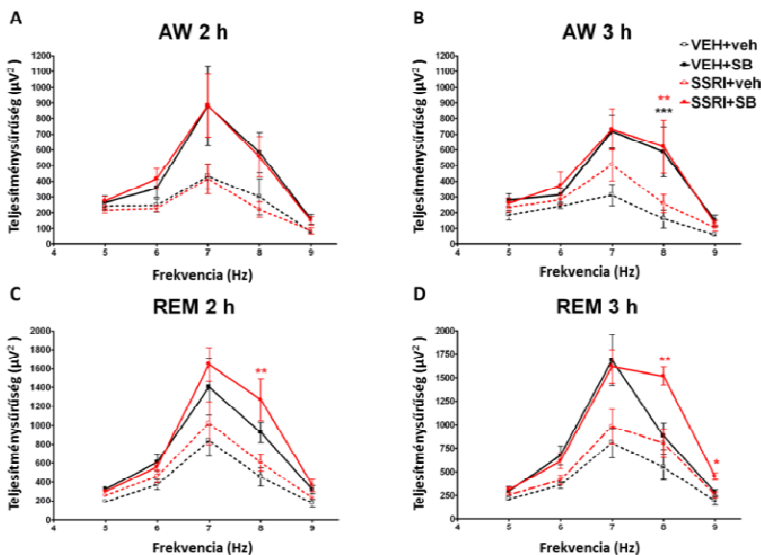
6. ábra Az EEG teljesítménysűrűség (Q-EEG) spektrum a REM-megvonás utáni visszaalvás összegzett első 2 órájában a lassú hullámú alvás stádiumaiban. A theta (5-9 Hz) és alfa (10-13 Hz) hullámok teljesítménysűrűsége a felszínes (SWS-1) (A) és mély (SWS-2) (B) lassú hullámú alvás során. Az ábrák az átlagokat és a standard hibaértékeket (SEM) prezentálják, csoportonként 6-7 állat adatainak felhasználásával.

*, ** és ***: szignifikáns ($p<0,05$, $p<0,01$ és $p<0,001$) Tukey post hoc hatások az RD-VEH és a HC-VEH csoportok között. #, ## és ###: szignifikáns ($p<0,05$, $p<0,01$ és $p<0,001$) Tukey post hoc hatások az RD-VEH és a HC-SSRI csoportok között; &: szignifikáns ($p<0,05$) Tukey post hoc hatás az RD-SSRI és a RD-VEH csoportok között;

A REM alvás-megvonás markáns emelkedést okozott a theta hullámok (5-9 Hz) teljesítménysűrűségében az SWS-1 és SWS-2 stádiumokban a HC csoportokhoz képest. Továbbá az alvás-megvonás fokozta az alfa frekvenciák (10-13 Hz) teljesítménysűrűségét is SWS-1-ben. A krónikus SSRI adagolás megelőzte az REM-megvonás fent említett hatásait (6. ábra).

4.2 Escitalopram-5-HT_{2C} receptor kísérlet

Q-EEG



7. ábra A theta frekvenciák (5-9 Hz) teljesítménysűrűség spektruma az SB-242084 kezelést követő második és harmadik órában aktív ébrenlét (AW; A, B) és REM (C, D) fázisokban. Az ábrák az átlagokat és a standard hibaértékeket (SEM) prezentálják csoportonként 6-7 állat adatainak felhasználásával. * és **: szignifikáns különbségek ($p<0,05$ és $p<0,01$) a Tukey post hoc tesztek alapján az SSRI+SB és

VEH+veh csoportok között; ***: szignifikáns különbség ($p < 0,001$) a Tukey post hoc teszt alapján az VEH+SB és VEH+veh csoportok között;

A krónikus escitalopram előkezelés nem befolyásolta az SB-242084 théta teljesítménynövelő hatását az AW és a REM fázisok 2. és 3. órájában, mivel nem találtunk szignifikáns interakciót az előkezelés és a kezelés hatások között. A legprominensebb emelkedés AW esetében a 3. órában 8 Hz-nél jelentkezett, mind a VEH+SB, mind pedig az SSRI+SB csoportban. A REM alvás esetében az SSRI+SB csoportban találtuk a legnagyobb fokozódást 8 Hz-nél (2. óra, 3. óra) és 9 Hz-nél (3. óra) (7. ábra).

5 Következtetések

- Eredményeink alapján a 72 órás „flower pot” módszert követő 2 órában REM-visszacsapást, valamint alvás- és REM fragmentációt figyeltünk meg. Mivel a szakirodalmi adatok alapján a legtöbb depressziós betegben és egyes depresszió-szerű állapotot előidéző rágsáló modell esetében is fokozott REM-nyomást, alvás- és REM fragmentációt figyeltek meg, eredményeinkből arra következtetünk, hogy a szub-krónikus REM alvás-megvonás a „flower pot” protokoll segítségével alkalmas lehet a szorongás vagy a depresszió modellezésére, legalábbis az alvás tekintetében.
- Mivel a Markov-analízis és a Q-EEG alapján a 24 napos escitalopram kezelés kivédte az REM-megvonás után bekövetkező változások többségét, a szub-krónikus „flower pot” módszer, mint depresszió modell, jó prediktív validitását feltételezzük. Elképzelhető, hogy az escitalopram fázisátmeneti valószínűségekre gyakorolt kedvező hatása a többi SSRI és egyéb antidepresszáns esetén is jellemző lehet, ami felhívja a figyelmet a Markov-lánc modell alváskutatásban való alkalmazásának igényére. Az általunk alkalmazott időben folytonos Markov-modell egy olyan statisztikai eszköz, mely a hagyományos alvás metrikákhoz képest a hipnogram alaposabb analízisét magasabb statisztikai erővel teszi lehetővé, habár jelenleg még vannak korlátai.

- Eredményeink alapján a 21 napos escitalopram kezelés nem befolyásolta az SB-242084 théta aktivitást fokozó hatását aktív ébrenlét és REM fázisokban, így valószínű, hogy a théta hullámok szabályozásáért felelős 5-HT_{2C} receptorok nem érintettek az antidepresszáns kezelés hatására bekövetkező adaptív változásokban. Figyelembe véve, hogy a théta oszcillációkat a tanulás- és memória-folyamatokkal hozták összefüggésbe, ez az eredmény felveti annak a lehetőségét, hogy a krónikus antidepresszáns kezelés során alkalmazott 5-HT_{2C} receptor antagonistá hatású augmentációs terápiák feltételezett koncentrációfokozó tulajdonsága megmaradhat.

6 Saját publikációk jegyzéke

6.1 Az értekezéshez kapcsolódó közlemények listája

1. Kostyalik D, Katai Z, Vas S, Pap D, Petschner P, Molnar E, Gyertyan I, Kalmar L, Tothfalusi L, Bagdy G (2014a) Chronic escitalopram treatment caused dissociative adaptation in serotonin (5-HT) 2C receptor antagonist-induced effects in REM sleep, wake and theta wave activity. *Experimental brain research* 232:935-946.
2. Kostyalik D, Vas S, Katai Z, Kitka T, Gyertyan I, Bagdy G, Tothfalusi L (2014b) Chronic escitalopram treatment attenuated the accelerated rapid eye movement sleep transitions after selective rapid eye movement sleep deprivation: a model-based analysis using Markov chains. *BMC Neurosci* 15:120.

6.2 Az értekezéshez nem tartozó, független közlemények listája

1. Bergman P, Adori C, Vas S, Kai-Larsen Y, Sarkanen T, Cederlund A, Agerberth B, Julkunen I, Horvath B, Kostyalik D, Kalmar L, Bagdy G, Huutoniemi A, Partinen M, Hokfelt T (2014) Narcolepsy patients have antibodies that stain distinct cell populations in rat brain and influence sleep patterns. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111:E3735-3744.
2. Katai Z, Adori C, Kitka T, Vas S, Kalmar L, Kostyalik D, Tothfalusi L, Palkovits M, Bagdy G (2013) Acute escitalopram treatment inhibits REM sleep rebound and activation of MCH-expressing neurons in the

lateral hypothalamus after long term selective REM sleep deprivation. Psychopharmacology (Berl) 228:439-449.

3. Vas S, Katai Z, Kostyalik D, Pap D, Molnar E, Petschner P, Kalmar L, Bagdy G (2013) Differential adaptation of REM sleep latency, intermediate stage and theta power effects of escitalopram after chronic treatment. J Neural Transm 120:169-176.

4. Volk B, Nagy BJ, Vas S, Kostyalik D, Simig G, Bagdy G (2010) Medicinal chemistry of 5-HT_{5A} receptor ligands: a receptor subtype with unique therapeutical potential. Curr Top Med Chem 10:554-578.